

# 超声波破碎仪在降解检材制备中的应用

桑海静<sup>1</sup> 徐晓宁<sup>1</sup> 余政梁<sup>2</sup> 夏俊苓<sup>1</sup> 李晨<sup>1</sup> 申去非<sup>3</sup>

1.天津市公安局物证鉴定中心, 天津 300384

2.公安部物证鉴定中心, 北京 100038

3.天津市公安局津南分局物证鉴定所, 天津 300350

**摘要:** 目的: 使用 Q800R3 超声波破碎仪处理提取纯化后的案件生物物证检材 DNA 制作模拟降解检材样本, 比较 DNATyper™ 30、VersaPlex 27PY 两种扩增试剂盒在扩增案件降解检材时的效果, 讨论基因座引物长度不同对降解检材扩增效果的影响。方法: 通过测试 1ng/ul 2800M 在 Q800R3 超声波破碎仪不同处理时间下和梯度浓度 2800M 在 Q800R3 超声波破碎仪在相同处理时间下扩增产物分型图谱中各基因座等位基因变化研究其打断效果及制备模拟降解检材的实验中的参数。设定适当的实验参数, 使案件样本制作模拟降解检材, 经、DNATyper™ 30 两种扩增试剂盒扩增, 分析电泳结果。结果: 随着打断时间的增加, 处理 16min 后长度大于 200bp 的基因片段检出峰高逐渐降低, 当处理时间大于 30 分钟, 长度大于 300bp 的基因片段开始出现等位基因丢失。当浓度为 0.2ng/ul 时, 长度大于 300bp 的片段开始出现等位基因丢失。讨论: Q800R3 超声波破碎仪可以应用于模拟降解检材制备, 在处理过程中需要反复离心, 保证 DNA 被充分打断。VersaPlex 27PY、DNATyper™ 30 两种扩增试剂盒对降解检材的检验效果均较好。引物的设计可以显著影响降解检材的扩增效果, 后续针对降解检材的试剂盒研发可以进一步优化引物长度, 提高对降解检材的灵敏度。

**关键词:** 法医遗传学; 模拟降解检材制备; DNATyper™ 30; VersaPlex 27PY; 超声波打断; 案件样本

在各类刑事案件现场的生物物证检验中, 常会遇到各种各样的降解生物检材。降解检材的检验也是法医物证检验遇到的难题和挑战。国内外学者从样本的采集与保存、样本的处理及核酸检测等方面对降解检材检验进行了大量深入研究, 其中遗传标记的选择至关重要, 目前缩短扩增产子的长度是提高降解生物检材 DNA 检出率的主要策略, 如 MiniSTR, 单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs)、插入/缺失多态性 (insertion-deletion, InDel)、插入/删除多态性 insertion or null, INNUL) 等遗传标记<sup>[1]</sup>。微单倍型、核小体等新型遗传标记, 还需要继续深入的研究应用。此外二代测序技术的发展和研究也为降解生物检材的 DNA 分型提供了更多的方法和可能性<sup>[2]</sup>。而在研发新试剂对降解检材检测效果评估、不同试剂盒对降解检材检出效果的比较、传统检验方法与二代测序等新技术对降解检材检测效果的比较、不同实验室对降解检材检测能力的评估等工作中, 都需要有大量的降解检材进行实验, 实际工作中能收集到的降解检材数量有限, 本文利用超声波破碎仪制备模拟降解检材进行一些尝试, 希望对大家有所帮助。

降解检材在宏观上是指: 暴露在自然环境中, 被各种外在因素 (如天气、温度、湿度、光照、以及生物、化学

因素) 作用后的陈旧检材。微观上是指: 检材 DNA 分子中的大片段断裂成数个小片段, 小片段 DNA 碎片化或经过化学修饰, 出现片段断裂, 或是片段丢失的现象<sup>[3]</sup>。模拟降解检材主要是对长链 DNA 进行分子片段化处理, 从而获得类似于降解检材的实验样本。常用的 DNA 片段化方法主要有四种, 分别是 DNA 限制性酶切法、水动力剪切法、超声波断裂法和喷射雾化法。超声打断基于水动力剪切法和超声波断裂法, 是最常见的 DNA 片段化方式, 其原理是液体在高频率的脉冲作用下, 产生无数的高压点和低压点, 伴随产生的空化泡存在几毫秒又因压力变化而爆破, 在这个过程中液体内形成瞬时高强度剪切力, 这种作用力可以破碎细胞、影响蛋白质和剪切 DNA。超声波破碎仪是将 DNA 置于均匀的超声体系中进行片段化处理的有效设备。

本文使用 Q800R3 超声波破碎仪按时间梯度处理浓度为 1ng/ul 的 2800M, 用相同的时间打断不同浓度 2800M 探索制备模拟降解检材的实验条件。同时使用 VersaPlex 27PY、DNATyper™ 30 两种扩增试剂盒检验经 Q800R3 超声波破碎仪打断的由全自动 96 道微量 DNA 提取工作站提取纯化后的案件 DNA 样本, 比较制备的模拟降解检材通过同一基因座的不同引物扩增后的检验效果。本文通过以

上实验研究超声波设备在制备模拟降解检材方面的可行性，探讨不同基因座设计对降解检材检验的影响。

## 1 实验设备与条件设置

### 1.1 实验设备

全自动 96 道微量 DNA 提取工作站

Q800R3 超声波破碎仪

ProFlex™ Base

3500XL 型遗传分析仪

### 1.2 实验条件设置

#### 1.2.1 样本类型：

打断时间实验：2800M（浓度 1ng/ul）；

浓度梯度打断实验：2800M（浓度 1ng/ul、0.8ng/ul、0.6ng/ul、0.4ng/ul、0.2ng/ul）

64 份纯化提取后的案件 DNA 样本（浓度在 1ng/ul 左右）

#### 1.2.2 Q800R3 超声波破碎仪参数设置

超声体积：35ul（1.5EP 管）

振幅设置：25%

超声脉冲：pulses on 30s, pulses off 15s

超声时间：打断时间实验：12min、16min、20min、24min、28min、32min、36min、40min；浓度梯度打断实验：18min；两种试剂盒检验效果比较实验：18min

设置温度：4℃

#### 1.2.3 扩增参数设置

扩增体系：10ul（3ulDNA 模板+7ul 扩增混合液），扩增程序参照 VersaPlex 27PY、DNATyper™ 30 两种扩增试剂盒说明书，循环参数：29。

## 2 实验结果

### 2.1 不同打断时间的效果

随着打断时间的增加，处理 16min 后长度大于 200bp 的基因片段检出峰高逐渐降低，当处理时间大于 30 分钟，长度大于 300bp 的基因片段开始出现等位基因丢失现象（图 1-3）。

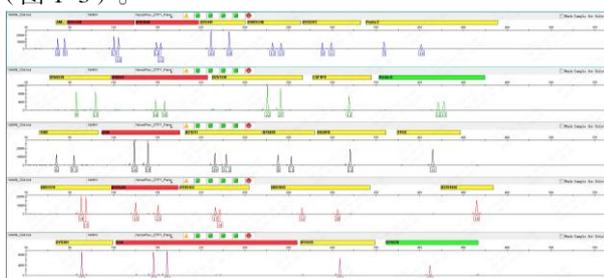


图 1 处理 14 分钟效果



图 2 处理 24 分钟效果



图 3 处理 32 分钟效果

### 2.2 不同浓度的打断效果

随着浓度降低，相同时间大片段等位基因的峰高逐渐降低。当浓度为 0.2ng/ul 时，长度大于 300bp 的片段开始出现等位基因丢失现象（图 4-6）。

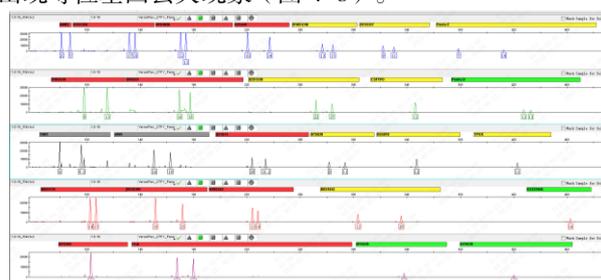


图 4 浓度 1ng/ul 处理 18 分钟效果

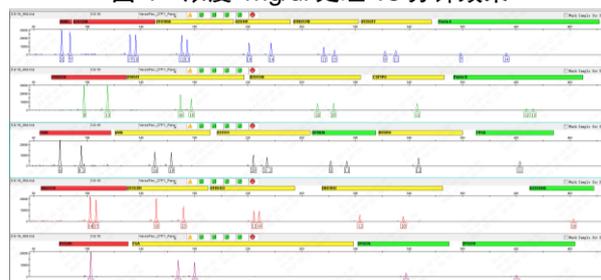


图 5 浓度 0.6ng/ul 处理 18 分钟效果

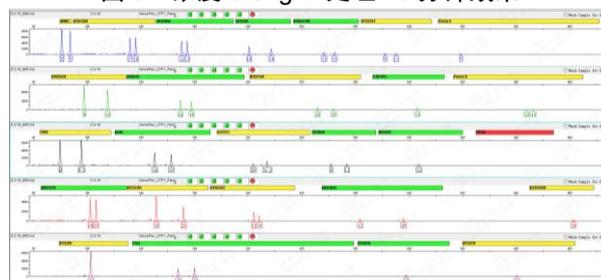


图 6 浓度 0.2ng/ul 处理 18 分钟效果

### 2.3 两种试剂盒对模拟降解检材检验比较

使用 VersaPlex 27PY、DNATyper™ 30 两种扩增试剂盒对 Q800R3 超声波破碎机处理后的案件 DNA 样本进行扩增检测, 64 份样本的电泳图谱均显现出随着 DNA 片段长度增长, 等位基因峰高显著降低 (图 7,8)。

从两种扩增试剂盒的检验结果中可以发现, 两个试剂盒同时包含的部分基因座, 如 D2S441、Penta E、Penta D、D10S1248 等, 因其在各自扩增体系中位置不同, 可以发现其基因座位置越靠前, 越容易扩增成功。

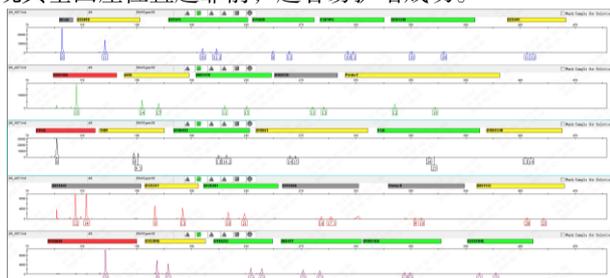


图 7 DNATyper™ 30 检验结果

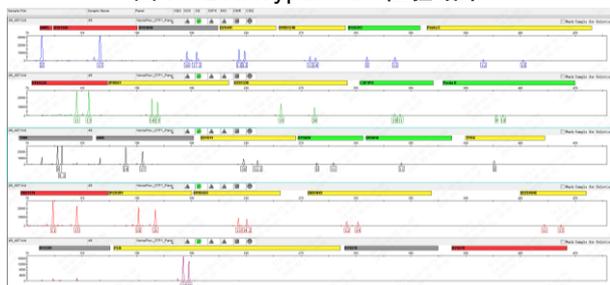


图 8 VersaPlex 27PY 检测结果

### 3 讨论

通过本次实验可以发现, 经过超声打断的 DNA 模板表现出明显的大片段扩增产物降低, 并随着打断处理时间延长, 会进一步表现为等位基因丢失。同时, 随着 DNA 样本浓度的降低, 超声打断的效果会显著增加。这表明通过超声打断可以成功完成模拟降解检材的制备, 可以应用于试剂盒检验效果测试、二代测序文库构建、染色质剪切等实验。振幅 25%, DNA 溶液体积为 35ul 时处理时间在 18 分钟以上可以得到较好效果, 如果需要制备大片段缺

失样本, 可以将处理时间延长至 34 分钟以上。但在使用时需要注意, 由于超声打断的工作原理, 在进行打断实验时, 如果 DNA 溶液不能充满离心管或者八联管, DNA 溶液会在超声震动下飞溅到管壁上, 而且振幅设置越高, DNA 溶液的表面积越大, 飞溅到管壁上的液滴越多。这些飞溅到管壁上的小液滴中的 DNA 会因脱离超声环境而无法得到有效打断, 因此在进行超声打断实验时, 如果 DNA 溶液不能充满离心管或者八联管, 则需要每隔几分钟中止打断, 对离心管或八联管进行离心, 保证溶液内所有 DNA 能充分被超声打断。

通过分析 DNATyper™ 30 和 VersaPlex 27PY 两种扩增试剂盒的检验结果, 可以发现两种试剂盒对降解检材都有较好的扩增效果。通过分析 D2S441、Penta E、Penta D、D10S1248 等基因座的等位基因峰高可以发现, 通过对基因座引物长度设计的调整, 可以有效提高大片段等位基因的检出率。在进行基因座引物设计时, 可以尽量优化引物长度。或者设计出不同基因座顺序的试剂盒, 在扩增降解检材时可以实现相互补充。

#### 参考文献:

- [1]张幼芳,王琴.应用 MiseqFGx 平台检测降解骨骼样本效果初探[J].中国法医学杂志,2017,32(5):512-513.
  - [2]王琳,董春楠,丛斌.降解生物检材 DNA 分析研究新进展[J].中国法医学杂志,2021,36(2):184-187.
  - [3]熊磊,孔倩倩,杨越,白慧茹,顾捷,等.降解检材的研究进展[J].生命科学仪器,2020,18(12):25-31.
- 作者简介: 桑海静, 女, 山东潍坊人, 医学硕士, 副主任法医师, 研究方向为法医遗传学。
- 基金项目: 北京市现场物证检验工程技术研究中心开放课题项目 (2022CESSKFKT02)。